

AKTIVITAS ENZIM 2,4-D MONOOKSIGENASE DARI BERBAGAI MIKROBA*

[2,4-D monooxygenase Activity of Some Microorganisms]

Nunik Sulistinah

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi - LIPI

ABSTRACT

Nine cultures both from fungi and bacteria have been selected for testing their 2, 4-D monooxygenase activity to degrade 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). The results showed that all the cultures which were tested grows at 1000 ppm 2, 4-D. Three cultures (*Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* and Isolat E (unidentified)) of the nine cultures are able to grow at 4000 ppm. *T. viride* grows well on Minimal Basal Media which contained glucose and 2000 ppm 2, 4-D and produced the highest biomass (0.8660 g/l) than the others. The biomass of *T. viride* grew on MBM (without glucose) and added with 2000 ppm 2, 4-D is 0.6520 g/l. This indicated that the culture is tolerant to 2, 4-D and able to use 2, 4-D compound as energy and carbon sources for its growth. But we failed to prove the 2, 4-D monooxygenase activity of supernatant of *T. viride* by measuring the changing of pH-value in the 2, 4-D breakdown-reaction.

Kata kunci/keywords: *Trichoderma viride*, 2, 4-D monooksigenase/2, 4-D monooxygenase, 2, 4-D (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid), aromatik herbisida yang mengandung khlor/chlorinated aromatic herbicide.

PENDAHULUAN

Senyawa-senyawa aromatik yang mengandung khlor (*chlorinated aromatic compounds*), seperti 2-Methyl 4-Chlorophenoxyacetic acid (MCPA); 2,4,5-Trichlorophenoxy-acetic acid (2,4,5-T); 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D); 1,2-Dichlorobenzene. Pentachlorophenol banyak digunakan sebagai herbisida, pestisida, pengawet, pelarut dan minyak pelumas. Sebagian besar senyawa-senyawa tersebut sangat toksik, *recalcitrant* dan merupakan polutan utama pada lingkungan, karena cenderung terakumulasi di ekosistem yang tercemari (Donnelly *et al.*, 1993; Daugherty & Karel, 1994). Senyawa-senyawa tersebut mengkontaminasi atau mencemari perairan-perairan dalam tanah terutama lewat resapan, aliran air dari lahan-lahan pertanian atau dari tempat-tempat pembuangan limbah (Clarkson *etal*, 1993).

Salah satu contoh dari senyawa aromatik yang mengandung khlor yang mempunyai arti ekonomi tinggi adalah 2,4-Dichlorophenoxyacetic

acid (2,4-D). Senyawa tersebut telah digunakan secara luas sebagai herbisida selama lebih dari 40 tahun Ka, *et al.*, 1994; Rai, 1992; Daugherty *et al.*, 1994) dan diaplikasikan sebagai "postemergence herbicide" di lahan pertanian dan perkebunan untuk mengendalikan pertumbuhan gulma berdaun lebar dan rumput-rumput liar (Beste, 1983; Martin & Worthing, 1977). Residu dari 2,4-D dapat bertahan dalam waktu yang cukup lama, sehingga dapat mengganggu keseimbangan ekosistem yang dicemarinya.

Persistensi herbisida dan senyawa-senyawa senobiotika lainnya ditentukan oleh kestabilan senyawa-senyawa tersebut dan keberadaan mikroorganisme yang mampu merombaknya (Clarkson *et al.*, 1993). Ada beberapa laporan mengenai degradasi 2,4-D dengan mikroba, baik dengan kultur mumi maupun dengan kultur campuran. Mikroba yang dilaporkan mampu mendegradasi 2, 4-D antara lain *Achromohacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* dan *Streptomyces* (Bell, 1957; Don & Pemberton, 1981; Evan *et al*,

* Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Litbang dan Pendayagunaan Potensi Wilayah, Puslitbang Biologi - LIPI.

1971; Jensen & Peterson, 1952; Loos *et al.*, 1967; Rogoff & Reid, 1956; Walker & Newman, 1956).

Degradasi herbisida dalam tanah seperti halnya senyawa-senyawa hidrokarbon lain dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Donnelly, *et al.*, 1993). Pada umumnya degradasi 2,4-D secara mikrobiologis hanya terjadi pada daerah-daerah tropik dan pada tanah-tanah lembab, tetapi laju degradasinya ditentukan oleh kondisi lingkungan dan karakteristik tanah (Beste, 1983).

Di Indonesia, 2,4-D juga merupakan herbisida yang banyak diaplikasikan pada lahan-lahan pertanian dan perkebunan. Dengan demikian, residu dari senyawa tersebut juga mempunyai peluang yang tinggi dalam mencemari sumber-sumber air tanah. Oleh karena itu, informasi tentang keberadaan mikroba di wilayah tersebut yang mampu merombak 2,4-D dan mekanisme perombakannya menarik untuk diketahui.

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji tingkat toleransi dan kemampuan tumbuh berbagai mikroba yang diisolasi dari berbagai wilayah di Indonesia pada 2,4-D dan menguji aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase dari isolat-isolat tersebut. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan teknik-teknik bioremediasi air atau tanah yang tercemar oleh residu 2,4-D maupun senyawa-senyawa kerabatnya.

BAHAN DAN METODE

1. Mikroorganisme

Isolat-isolat yang digunakan, dicantumkan pada Tabel 1.

2. Media penumbuh untuk bakteri

Media untuk peremajaan isolat bakteri digunakan *nutrient agar* dengan komposisi: 3g *yeast extract*, 5g *pepton* dan 20g *bacto agar* (Difco) dalam 1000 ml aquadest, sedangkan untuk menumbuhkan isolat bakteri tersebut digunakan *broth media*. Untuk menguji kemampuan tumbuh bakteri pada 2,4-D digunakan metode Daerah

Hambat (*clearing zone*) dengan media Mueller Hinton.

3. Media penumbuh untuk jamur

Untuk peremajaan jamur digunakan media *taoge agar* (TA), sedangkan untuk pengujian kemampuan tumbuh jamur digunakan metode Daerah Hambat dengan media *malt extract agar* (MEA) yang komposisinya sebagai berikut: 20g *malt extract* (Difco), 20g *bacto agar* (Difco), 1g *pepton* dalam 1000 ml aquadest. Pengujian kemampuan tumbuh jamur secara kuantitatif dan kualitatif menggunakan *Minimal Basal Media* (MBM) dengan komposisi: 6g Na_2HPO_4 , 3g KH_2PO_4 , 1g NaNO_3 , 0,005 g CaCO_3 , 0,05g MgSO_4 , 0,05g MnSO_4 , 0,025 g FeSO_4 , 0,1% (w/v) glukosa, 0,001 % (w/v) *yeast extract*.

4. Herbisida

Herbisida yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2,4- *Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4- D) dengan konsentrasi 0, 250, 500, 750, 1000, 2000 dan 4000 ppm.

5. Pengujian kemampuan tumbuh mikroba pada

2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D)

5.1 Metode 1

Isolat bakteri ditumbuhkan pada *broth media* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, sedangkan untuk isolat jamur ditumbuhkan pada media MEA dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang ($\pm 28^\circ\text{C}$). Isolat-isolat tersebut diinokulasikan pada media Mueller Hinton padat (bakteri) dan media MEA (jamur) dengan menggunakan pipet steril. Di atas isolat yang telah ditumbuhkan pada media tersebut diletakkan *disk blank paper* (0,5 μl) yang telah direndam selama ± 5 menit dalam 2,4-D dengan berbagai konsentrasi (0, 250, 500, 750 dan 1000 ppm). Isolat yang tidak dihambat pertumbuhannya menunjukkan bahwa

isolat tersebut diduga mampu merombak/toleran terhadap 2,4-D.

5.2 Metode 2

Isolat ditumbuhkan pada MBM yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi 2000 dan 4000 ppm; untuk jamur diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang, sedangkan untuk bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat yang tumbuh menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut diduga mampu mendegradasi/toleran terhadap 2,4-D.

6. Pengukuran pertumbuhan *Trichoderma viride*

Pertumbuhan *T. viride* diukur dengan menimbang biomasa (berat kering miselia) dari jamur tersebut yang ditumbuhkan pada MBM cair yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi 2000 ppm dengan masa inkubasi 10 hari.

7. Pengukuran aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase

Aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase diukur dengan mengamati perubahan pH yang terbentuk pada interval waktu tertentu dari reaksi antara 5 ml larutan 2,4-D (0,2 g/100 ml aquadest) dengan 20 ml supernatan mikroba. Supernatan yang diberikan dalam reaksi tersebut berasal dari hasil pemusingan kultur yang berumur 10 hari dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

HASIL

Pengujian kemampuan tumbuh isolat dan pengukuran biomassa

Hasil pengujian menunjukkan bahwa keseluruhan mikroba yang diuji (9 isolat) dapat tumbuh pada Minimal Basal Media yang mengandung 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) sampai dengan konsentrasi 1000 ppm; 3 isolat diantaranya (*A. niger*, *T. viride* dan Isolat E) bahkan mampu tumbuh pada 2,4-D sampai dengan

konsentrasi 4000 ppm (Tabel 2). Oleh karena *T. viride* dapat tumbuh lebih baik dibandingkan dengan *A. niger* dan isolat E, maka untuk pengujian pengaruh media terhadap biomasa digunakan *T. viride*. Tabel 3 menunjukkan bahwa *T. viride* tumbuh paling baik pada minimal basal media (MBM) yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi 2000 ppm, karena biomasa yang diperoleh pada media tersebut (866 mg/l) lebih tinggi bila dibandingkan dengan biomassa *T. viride* yang ditumbuhkan pada media lain. Hal ini dapat diartikan bahwa *T. viride* dapat tumbuh dengan baik bila glukosa dan 2,4-D digunakan secara bersama-sama sebagai sumber karbon. Biomassa paling kecil (628 mg/l) diperoleh, bila *T. viride* ditumbuhkan pada MBM tanpa glukosa. Hal ini berarti bahwa isolat tersebut sebenarnya mampu memanfaatkan *yeast* yang ada dalam media tersebut sebagai sumber karbon.

Pengujian aktivitas enzim

Untuk memperoleh kepastian tentang kemampuan *T. viride* dalam mendegradasi 2,4-D, maka dilakukan pengujian aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase dari *T. viride*. Hasil pengujian supernatan dan sel utuh *T. viride* yang ditumbuhkan pada media *malt extract* ditampilkan pada Gambar 1 dan Gambar 2.

PEMBAHASAN

Dari 9 isolat yang diuji 3 di antaranya yaitu *A. niger*, *T. viride* dan isolat E tumbuh pada media yang mengandung 2,4-D sampai dengan konsentrasi 4000 ppm. Studi literatur menunjukkan bahwa 2,4-D didegradasi secara aktif oleh *Pseudomonas cepacia* pada konsentrasi 2000 ppm (Daugherty & Karel, 1994); beberapa strain bakteri yang diisolasi dari tanah mampu merombak 2,4-D pada konsentrasi 500 ppm (Jo *et al.*, 1994) dan lumpur aktif yang diaklimasi dengan 25,0 mg/l 2,4-D, 10 mg/l urea menunjukkan bahwa degradasi 2,4-D secara sempurna terjadi setelah dicapai kondisi stabil (setelah 20 hari aklimasi) (Xing *et al.*, 1995).

Dengan demikian, maka *A. niger*, *T. viride* dan isolat E yang diuji mempunyai toleransi terhadap 2,4-D lebih tinggi dibandingkan dengan hasil-hasil penelitian tersebut.

Perrumbuhan *T. viride* diukur dengan menimbang biomasa (berat kering) jamur yang ditumbuhkan pada media cair sebagaimana dijelaskan pada Bahan dan Metode. Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa biomasa *T. viride* yang ditumbuhkan pada MBM tanpa glukosa dengan penambahan 2,4-D, lebih tinggi dari biomasa yang ditumbuhkan pada MBM tanpa glukosa saja. Hal ini mengindikasikan bahwa *T. viride* bukan saja toleran tetapi mampu menggunakan 2,4-D sebagai sumber energi dan karbon untuk pertumbuhannya,

Hasil pengujian aktivitas enzim (Gambar 1 dan Gambar 2) menunjukkan bahwa ternyata aktivitas 2,4-D monooksigenase dari *T. viride* sangat rendah. Hal ini mungkin disebabkan karena sintesis enzim tersebut memerlukan induktor sehingga pada waktu *T. viride* ditumbuhkan pada media *malt extract* tanpa keberadaan 2,4-D aktivitas enzim tersebut tidak dapat terdeteksi. Untuk mengetahui apakah enzim 2,4-D monooksigenase bersifat induktif atau tidak, maka dilakukan pengujian terhadap supernatan *T. viride* yang ditumbuhkan pada MBM baik dengan maupun tanpa 2,4-D. Gambar 3 menunjukkan bahwa ternyata aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase juga tidak dapat terdeteksi. Dengan demikian, dari hasil pengujian yang ditampilkan pada Gambar 1, 2 dan 3 tidak dapat ditentukan apakah enzim tersebut bersifat konsitutif ataupun induktif. Tidak terdeteksinya aktivitas 2,4-D mono-oksidasenya dari *T. viride* padahal isolat tersebut mampu tumbuh pada 2,4-D (Tabel 2 & Tabel 3) mungkin dapat disebabkan karena a), aktivitas dari 2,4-D monooksidasenya sangat kecil, b). 2,4-D dapat dirombak oleh *T. viride* tetapi tidak sampai menghasilkan produk akhir yang berupa asam, sehingga adanya perubahan nilai pH dalam reaksi degradasi 2,4-D tidak dapat dideteksi, atau

c). metode penentuan aktivitas 2,4-D monooksidasenya masih belum tepat.

KESIMPULAN

Dari penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kesembilan mikroba yang diuji dapat tumbuh pada Minimal Basal Media yang mengandung 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) sampai dengan konsentrasi 1000 ppm; 3 isolat di antaranya (*A. niger*, *T. viride* dan Isolat E) bahkan mampu tumbuh sampai dengan konsentrasi 4000 ppm.
2. *T. viride* bukan saja toleran tetapi mampu menggunakan 2,4-D sebagai sumber energi dan karbon untuk pertumbuhannya, tetapi belum dapat dibuktikan adanya aktivitas enzim 2,4-D monooksigenase baik pada supernatan dan sel *T. viride*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Bambang Sunarko atas segala saran dan bimbingannya dalam penulisan makalah ini. Juga Dr. Irawati, Ir. Djaja Siti Hazar Hoesen dan Dra. Sumarni yang telah membantu dalam penyediaan 2,4-D.

DAFTAR PUSTAKA

- Bell GR. 1957.** Some Morphological and Biochemical Characteristic of a Soil Bacterium Which Decomposes 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Canadian Journal of Microbiology* 3, 821-840
- Beste CE (ed.). 1983.** *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*, 5th ed., p. 515. Weed Science Society of America, Champaign, III.
- Clarkson WW, Yang CP and Harker AR. 1993.** 2,4-D Degradation in Monoculture Biofilm Reactors. *Water Resources* 27, 1275-1284.

- Daugherty DD and Karel SF. 1994.** Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by *Pseudomonas cepacia* DBOI (pRO101) in a Dual -Substrate Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3261-3267.
- Don RH and Pemberton JM. 1981.** Properties of Six Pesticides Degradation Plasmids Isolated from *Alcaligenes eutrophus*. *Journal Bacteriology* 145, 681-686.
- Evans WC, Smith BSW, Fernley HN and Davies JL 1971.** Bacterial Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Biochemistry Journal* 122, 543-551.
- Fogarty MA and Tuovinen OH. 1991.** Microbiological Degradation of Pesticides in Yard Waste Composting. *Microbiological Reviews* 55, 225-233.
- Francis HC. 1995.** *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. John Wiley & Sons Inc. 365-368.
- Jensen HL and Peterson HI. 1952.** Detoxification of Hormone Herbicides by Soil Bacteria. *Nature* (London) 170, 39-40.
- Ka JO, Holben WE and Tiedje JM. 1994.** Analysis of Competition in Soil among 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1121-1128.
- Loos MA, Roberts RN and Alexander M. 1967.** Phenol as Intermediates in The Decomposition of Phenoxyacetates by an *Arthrobacter* species. *Canadian Journal Microbiology* 13, 377-385.
- Martin J and Worthing CR (eds.). 1977.** *Pesticide Manual*, 5th ed., p. 593. British Crop Protection Council, Thornton Heath, England
- Narain RJP. 1992.** Effects of Long-term 2,4-D Application on Microbial Populations and Biochemical Processes in Cultivated Soil. *Biology and Fertility of Soils* 13, 187-191.
- Rogoff MH and Reid JJ. 1956.** Bacterial Decomposition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Journal Bacteriology* 71, 303-307.
- Walker RL and Newman AS. 1956.** Microbial Decomposition of 2,4-Dichloro-phenoxyacetic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 4, 201-206.
- Xing X-H, Yoshino T, Puspita NF and Unno H. 1995.** Behavior of 2,4-Dichloro-phenoxyacetic Acid Degradation and Nitrogen Conversion by an Activated Sludge. *Biotechnology Letters* 17, 335-340.